

09/673643

52 Rec'd PCT/FTO 31 OCT 2000

DOCKET NO. M&M-031-USA-PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:
M. Yokoi, et al.

Serial No.: Corresponding to PCT/JP99/02442
filed May 12, 1999

Filed: Concurrently herewith

For: Immunoassay Reagent And Immunoassay Method

CLAIM FOR PRIORITY

Honorable Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications filed in Japan are hereby requested for the above identified application and the priority provided in 35 U.S.C. 365 is hereby claimed:

Japanese patent application No. 133995/1998 filed May 15, 1998

Japanese patent application No. 366818/1998 filed December 24, 1998

Japanese patent application No. 366819/1998 filed December 24, 1998

Japanese patent application No. 366820/1998 filed December 24, 1998

In support of this claim, certified copies of each of said original foreign applications was filed with the International Bureau on July 2, 1999, as evidenced by form PCT/IB/304, which is attached.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

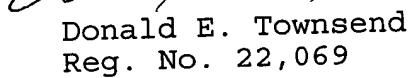
09/673643
526 Rec'd PCT/T.O 31 OCT 2000

DOCKET NO. M&M-031-USA-PCT

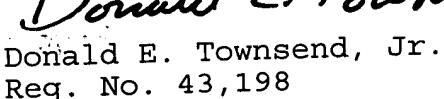
It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. 365 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these documents.

Respectfully submitted,

TOWNSEND & BANTA



Donald E. Townsend
Reg. No. 22,069



Donald E. Townsend, Jr.
Reg. No. 43,198

TOWNSEND & BANTA
1225 Eye Street, N.W.
Suite 500
Washington, D.C. 20005
(202) 682-4727

Date: October 31, 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12.05.99

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 02 JUL 1999
WIPO PCT

JP99/2442

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 5月15日

出願番号
Application Number:

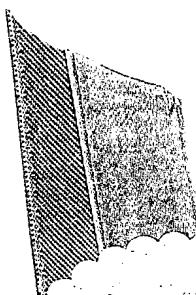
平成10年特許願第133995号

出願人
Applicant(s):

積水化学工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT

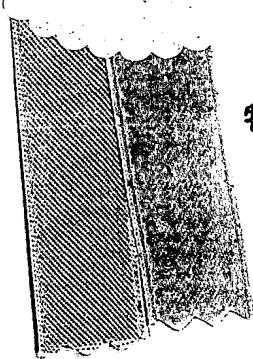
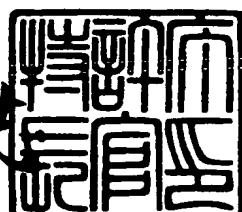
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3039290

【書類名】 特許願
【整理番号】 98P01149
【提出日】 平成10年 5月15日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明の名称】 免疫測定法
【請求項の数】 1
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社
内
【氏名】 吉川 勝己
【特許出願人】
【識別番号】 000002174
【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社
【代表者】 西澤 進
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 005083
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫測定法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、

（a）上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体、

（b）上記酵素に対する抗体、及び

（c）上記酵素の基質

と上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、不溶性担体を利用する免疫測定法、特に、測定対象物質を高感度で測定可能な免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

【0003】

免疫測定法としては、免疫比濁法（TIA法）、ラテックス比濁法（LIA法）、酵素免疫測定法（EIA法）、放射免疫測定法（RIA法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、TIA法やLIA法が使用されている。TIA法やL

I A法では、測定する生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質(CRP)、抗ストレプトリジン-O抗体(ASO)、フィブリン分解産物(FDP)などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数ng/mL以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、EIA法やRIA法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、 α フェトプロテイン(AFP)に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数ng/mL以下の場合に用いられる。

【0004】

更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、EIA法やRIA法などが益々利用されてきている。しかしながら、EIA法やRIA法は、TIA法やLIA法が測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置(以下、汎用自動分析装置)へ適用可能であるのに比べて、反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や放射性同位元素の種類が種々あるため、特定の自動分析装置(以下、専用自動分析装置)へのみ適用される場合が多く、RIA法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種々の問題がある。

【0005】

近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できるような方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、LIA法やEIA法の変法または改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、LIA法やEIA法などでは従来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。

【0006】

測定法自体の精度を上げる手法としては、LIA法の不溶性担体を着色する方法(特開平1-214760号公報)、EIA法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法(特開平5-34346号公報)などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平3-16

7475号公報に提案される方法がある。

【0007】

しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、EIA法やRIA法に代表される微量成分の測定法は、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なるためであるが、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法は、B/F分離と呼ばれる操作（Bは反応により結合したもの、Fは未反応のもの）が必ず必要であるため、B/F分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B/F分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

【0008】

最近、特開平5-249112号公報、特開平7-179495号公報などにみられるように、B/F分離の不必要的測定法も提案、開発されつつあるが、感度不足、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置しか適用できないなどの問題がある。

【0009】

一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声が大きい。

【0010】

以上の記述を要約すると、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザーの強い要望があるにもかかわらず、B/F分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題点を解決するものであり、その目的は、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要とせず簡便に測定できる免疫測定法を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

以下、本明細書において、一文章中に、抗原（または抗体）という表現と、抗体（または抗原）という表現がある場合、括弧内は括弧内同士が対応し、括弧外は括弧外同士が対応しているものとする。

【0013】

本発明者は、上記のような課題に鑑み、新規でかつ従来と同等もしくはそれ以上に感度が高く、かつ、汎用自動分析装置へ適用可能な免疫測定法の開発のため、銳意研究を重ねた結果、B／F分離の必要がない微量成分の新規分析法を完成するに至った。

【0014】

すなわち、本発明の免疫測定法は、試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、

(a) 上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体、

(b) 上記酵素に対する抗体、及び

(c) 上記酵素の基質

と上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法である。

【0015】

【作用】

以下、本発明の作用について詳細に述べる。

同一の不溶性担体上に、生体試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体を含む第1試薬と、上記酵素に対する抗体（以下、抗酵素抗体という）と上記酵素の基質を含む第2試薬とを、上記測定対象物質が含まれている生体試料と混合すると、2種類の反応が進行する。第1の反応は、生体試料中の抗原（または抗体）と不溶性担体に担持された抗体（または抗原）との抗原抗体反応である。この第1の反応はL

IA法と同原理であり、第1の反応により、不溶性担体の凝集が起こり、濁りが上昇し吸光度変化が生じる。一方、第2の反応は酵素と基質による反応であり、EIA法の検出と同原理であり、基質が変化することにより、吸光度変化が生じる。

【0016】

第1の反応と第2の反応は互いに独立してかつ同時に起きるため、吸光度変化量はLIA法より大きくなり生体試料中の微量成分の測定が可能となる。しかしながら、第1の反応は、生体試料中に含まれる抗原（または抗体）の量に依存して吸光度が変化するが、第2の反応は、酵素と基質の反応であるため、生体試料中に含まれる抗原（または抗体）の量に依存した反応ではない。

【0017】

そこで、本発明者は、銳意研究を重ねた結果、抗酵素抗体を該反応系に添加することにより、第2の反応が生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存するようになることを見出した。抗酵素抗体は酵素に結合すると酵素活性を失活または減少させるものであるが、生体試料中に抗原（または抗体）が含まれていない時は、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じていないため、抗酵素抗体が不溶性担体上の酵素に結合して酵素を失活させ、酵素による吸光度変化を生じさせない。これに対して、生体試料中に抗原（または抗体）が含まれると、第1の反応による不溶性担体の凝集が生じる。この時、凝集に関与している不溶性担体上の酵素と抗酵素抗体との結合は、凝集塊の立体障害のため起こりにくくなり、酵素が失活せず基質と反応し吸光度変化が生じる。

【0018】

このようにして、抗酵素抗体を該反応系に添加することにより、第2の反応も生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存させることができるようになる。このように、本発明の免疫測定法は、第1の反応と第2の反応が共に、生体試料中の抗原（または抗体）の量に依存した反応となるため、LIA法より高感度であり、かつ、EIA法などと違って、B/F分離の必要がない新規な免疫測定法となる。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明により測定される測定対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げられ、例えば、肝炎（B型、C型）由来抗原または抗体；HIV抗原または抗体；梅毒由来抗原または抗体； α -フェトプロテインに代表される癌マーカー；インシュリンに代表されるホルモン；オータコイドなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。

【0020】

本発明に使用される不溶性担体としては、例えば、有機高分子粉末、微生物、血球および細胞膜片等が挙げられる。有機高分子粉末としては、例えば、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉末；ポリスチレン、スチレンースチレンスルホン酸（塩）共重合体、スチレンーメタクリル酸共重合体、アクリロニトリルーブタジエンースチレン共重合体、塩化ビニルーアクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニルーアクリル酸エステル共重合体などの合成高分子粉末などが挙げられる。特に、合成高分子粉末を均一に懸濁させたラテックスが好ましい。上記不溶性担体は、その使用目的・用途などにより異なるが、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基などを導入した不溶性担体も適宜使用可能である。上記ラテックスを用いる場合、そのラテックス粒子の粒径は、0.05~1.5 μm が好ましく、0.1~0.6 μm がより好ましい。

【0021】

本発明に使用される酵素としては、基質と反応して吸光度変化を生じるものであれば特に限定されない。例えば、パーオキシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられるが、特にこれらに限定されない。酵素には、天然物から得られたもの、遺伝子工学的手法により得られたものなどあるが、いずれも使用可能である。通常は、天然物から得られたものを使用すればよい。

【0022】

また、上記酵素を測定に使用する際は、適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G

○ d 緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。酵素の使用時の濃度としては、0.001~10 IU/mLが好ましいが、使用する酵素の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0023】

次に、本発明に使用される基質は、使用する酵素と反応して吸光度変化を生じるものが用いられる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを使用する場合は基質としてo-フェニレンジアミンやピロガロール、酵素としてアルカリフェオスマターゼを使用する場合は基質としてp-ニトロフェニルリン酸、酵素としてβ-ガラクトシダーゼを使用する場合は基質としてo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシドなどが挙げられるが、特に限定されず、目的・用途に応じて適宜選択される。

【0024】

上記の基質は、通常、化学合成により製造するか、または、市販されているものを使用する。測定に使用する際は適当な緩衝液などに溶解・希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G o o d 緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。基質の使用時の濃度としては、0.1~1000 mMが好ましいが、使用する基質の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0025】

次に、本発明に使用される抗酵素抗体としては、使用する酵素と結合して酵素活性を失活させるものであれば、特に、限定されず、使用する酵素によりそれに対応した抗体を用いる。抗体種としてはポリクローナル抗体、モノクロナール抗体のいずれでもよく、また、製造方法についても、公知の方法のいずれでもよい。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、山羊、めん羊などの動物に使用する酵素を免疫して產生させればよい。モノクロナール抗体についても公知の方法を用いて得ることができる。このようにして得られた抗体については公知のクロマトグラフィーなどによって適宜精製してもよいし、場合によっては特別の精製をせ

ずに用いてもよい。また、測定に使用する際は適当な緩衝液などで希釈して用いる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、Good緩衝液などが挙げられるが、特に限定されず、使用する酵素や基質の特性を考慮し、適宜選択すればよい。抗酵素抗体の使用時の濃度としては、0.01～10mg/mLが好ましいが、使用する抗体の種類により異なるため、この範囲に限定されるわけではない。

【0026】

本発明で用いる、抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体（a）を製造する方法について説明する。

不溶性担体への抗原（または抗体）と酵素の結合方法は、使用する抗原（または抗体）及び酵素の種類により異なるが、通常、以下に示す方法で行う。抗原（または抗体）を含む溶液と酵素を含む溶液を同時に、または、順次、不溶性担体の懸濁液に添加し攪拌すると、物理的吸着により抗原（または抗体）と酵素が不溶性担体に結合する。

【0027】

また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されている不溶性担体については、適当な架橋剤を添加することにより、抗原（または抗体）と酵素を不溶性担体に結合させることができる。この場合、架橋剤で架橋できるように、抗原（または抗体）と酵素を修飾する必要がある。物理的に吸着させるか、架橋剤により結合させるかは、使用する抗原（または抗体）と酵素の物性や構造を考慮に入れ、適宜選択すればよい。

【0028】

上記結合反応時のpH及び温度は、使用する抗原（または抗体）、酵素及び不溶性担体により異なるが、pHは4～10、温度は2～50℃が好ましい。pHがこの範囲をはずれると、抗原（または抗体）がタンパク質であるため変性してしまうなどの問題がある。また、温度については、2℃未満であれば反応速度が遅く、所望の感度を有するものが得にくくなり、50℃を超えると、抗原（または抗体）が変性してしまうなどの問題がある。

【0029】

次に、本発明の免疫測定法の実施の一例について具体的に述べる。

測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体（a）を第1試薬とし、上記酵素に対する抗体（b）及び上記酵素の基質（c）を含む溶液を第2試薬とする。

測定対象物質である抗原（または抗体）を含む試料と第1試薬及び第2試薬を混合すると、試料中の抗原（または抗体）と不溶性担体に結合した抗体（または抗原）との抗原抗体反応による不溶性担体（a）の凝集が生じる。一方、酵素と基質（c）の反応による吸光度変化も生じる。凝集による吸光度変化と酵素反応による吸光度変化を光学的に測定することにより、試料中の抗原（または抗体）の量を測定する。測定波長は、使用する不溶性担体の種類、酵素と基質の種類により異なるが、250～1000nmが使用できる。この測定法において、抗原抗体反応および酵素反応の条件は通常の場合と同様であり、反応媒体としては、各種緩衝液が用いられる。この緩衝液は、生体試料中の抗原（または抗体）を失活させることなく、かつ、抗原抗体反応および酵素反応を阻害しないようなイオン強度及びpHを有するものであればよい。例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液などが使用される。反応温度は、10～50℃、特に20～40℃が好ましい。

【0030】

【発明の効果】

本発明の免疫測定法は、上述の通りであり、本発明によると、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B/F分離を必要としないので、簡便に測定できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度良く測定できるとともに、B／F分離を必要とせず簡便に測定できる免疫測定法を提供する。

【解決手段】 試料中の測定対象物質である抗原（または抗体）の量を測定するための免疫測定法であって、

（a）上記抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）と酵素とを担持させた不溶性担体、

（b）上記酵素に対する抗体、及び

（c）上記酵素の基質

と上記試料とを混合し、抗原抗体反応による不溶性担体の凝集反応と酵素反応を生じせしめ、生じた反応の度合いを測定することを特徴とする免疫測定法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

＜認定情報・付加情報＞

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000002174
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [000002174]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

氏 名 積水化学工業株式会社